

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-255807

(43)Date of publication of application : 21.09.1999

(51)Int.Cl.

C08B 37/00
C07H 5/04

(21)Application number : 10-082882

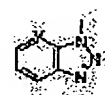
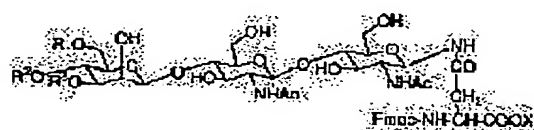
(71)Applicant : NOGUCHI INST

(22)Date of filing : 13.03.1998

(72)Inventor : INAZU TOSHIYUKI
MIZUNO MASAMORI**(54) ACTIVE ESTER DERIVATIVE OF SUGAR-CHAINED ASPARAGINE AND SYNTHETIC INTERMEDIATE****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an active ester derivative of sugar-chained asparagine, by developing a derivative capable of introducing a natural sugar chain into a specific substrate through an organic chemical procedure.

SOLUTION: An active ester derivative of sugar-chained asparagine is of formula I (wherein X represents formula II, in which Y is C of N; Fmoc is 9-fluorenylmethyloxycarbonyl; and R1, R2, and R3 are each H, a monosaccharide, or a sugar chain). This compd. is a derivative capable of introducing a sugar chain into an amino group-bearing derivative, and has a wide range of the applicability and a great industrial value, in that this compd. can introduce a sugar chain with cell recognition ability into a derivative of known medicines, reagents, agricultural chemicals, etc.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

26.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-255807

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月21日

(51) Int. Cl.⁴

識別記号

P I

C 0 8 B 37/00

C 0 8 B 37/00

Z

C 0 7 H 5/04

C 0 7 H 5/04

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-82892

(22) 出願日 平成10年(1998) 3月13日

(71) 出願人 000173924

財団法人野口研究所

東京都板橋区加賀 1-8-1

(72) 発明者 船津 敏行

神奈川県小田原市飯田岡165

(72) 発明者 水野 真盛

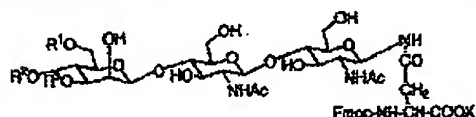
東京都板橋区板橋 2-10-11-302

(54) 【発明の名称】 糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体とその合成中間体

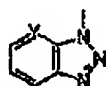
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】糖鎖の機能が発明されつつあるが、その合成は極めて困難で、長鎖の糖鎖を工業的に製造するレベルには達していない。一方で、酵素反応による糖鎖の調製も盛んに研究されているが、この方法では酵素の供給量に限りがあることから大量合成などに難があると言わざるを得ない。そこで、有機化学的な手法で、天然糖鎖を特定の基質へ導入できる誘導体を開発し、糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体を提供する。

【解決手段】下記式



【式中、Xは



を表す。ここでYは、CまたはNを示す。

Fmoc: 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

R¹、R²、R³は、Hまたは単糖、または糖鎖を表す。】で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体。

(2)

特開平11-255807

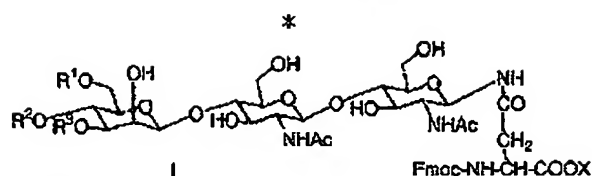
1

2

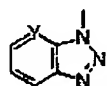
【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式

*【化1】



Xは



を表す。ここでYは、CまたはNを示す。

Fmoc: 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

R¹, R², R³は、Hまたは単糖、または糖鎖を表す。

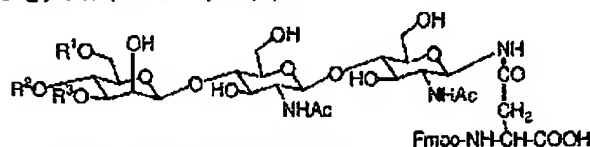
で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体。

※シカルボニル化して得られる一般式

【請求項2】糖タンパク質のプロテアーゼ処理によって

【化2】

得られる糖鎖アスパラギンを9-フルオレニルメチルオキ※



Fmoc: 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

R¹, R², R³は、Hまたは単糖、または糖鎖を表す。

で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体。

★【請求項5】一般式

【請求項3】一般式

【化2】で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体を溶解できる非プロトン性極性溶媒に溶解した請求項1で示される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体。

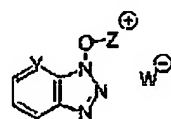
【請求項4】糖鎖が高マンノース型糖鎖であることを特徴とする請求項2記載の糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体。

【化2】で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体を溶解できる非プロトン性極性溶媒に溶解した請求項2で示される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体。

【請求項6】一般式

【化2】で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体を溶解できる非プロトン性極性溶媒中、一般式

★【化3】

Z⁺は、以下のいずれかを表す。

Yは、CまたはNを示す。

W⁻は、BF₄⁻, PF₆⁻のいずれかを表す。

で表されるベンゾトリアゾール誘導体と請求項2で示される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体からなる糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体合成用組成物。

【請求項7】一般式

【化2】で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体を溶解できる非プロトン性極性溶媒として、N-メチル-2-ピロリジノンまたはN,N-ジメチルホルムアミドを用いることを特徴とする請求項6記載の糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体合成用組成物。

【請求項8】一般式

【化2】で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導

体の合成中間体を溶解できる非プロトン性極性溶媒中、一般式

【化3】で表されるベンゾトリアゾール誘導体と請求項2で示される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体を反応させることを特徴とする糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体に関する。糖鎖は、その細胞表面での機能が解明されるに伴い、医薬や農業などの分野での利用が期待されている化合物群である。

(3)

特開平11-255807

3

4

【0002】

【従来の技術】糖鎖の機能が解明されつつあるが、その合成は極めて困難である。化学的に合成する方法としては様々な方法が報告されているが、いずれも長鎖の糖鎖を工業的に製造するレベルには達していない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】一方で、酵素反応による糖鎖の調製も盛んに研究されている。しかし、逐次単糖を結合させる方法では、結果的に化学法と同等である。これに対し、天然糖鎖を特定の基質に直接導入する方法として、エンド酵素による方法が報告されている。たとえば、本発明者らは*Mucor hiemalis*由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミナーゼの糖鎖転移活性を利用し、天然糖鎖を丸ごとN-アセチルグルコサミン1残基を有する基質へ転移できることを明らかにしている。しかしながら、これらの方法では酵素の供給量に限りがあることから大量合成などに難があると言わざるを得ない。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは有機化学的な手法で、天然糖鎖を特定の基質へ導入できる誘導体の開発を目指し、鋭意検討した結果、天然由来の糖鎖アスパラギンをFmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)化して得られるFmoc糖鎖アスパラギンを単離できること、これから誘導される、対応する活性エステル誘導体が、アミノ化合物を容易にアシル化できることを見出し、本発明に到達した。

【0005】すなわち、本発明の要旨は、非プロトン性極性溶媒中、一般式化2で表される糖鎖アスパラギン誘導体から製造することを特徴とする、一般式化1で示される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体とその合成中間体及び製造法である。

【化2】

【化1】

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0007】まず、一般式化2で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体となるFmoc糖鎖アスパラギンについて説明する。

【0008】Fmoc糖鎖アスパラギンの原料となる糖鎖アスパラギンは、アスパラギン側鎖アミド基の窒素原子に、周知のアスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖と呼ばれる糖鎖、すなわち、N-アセチルグルコサミン2残基、マンノース3残基からなる母核構造の非還元末端に種々の糖鎖が結合した糖鎖あるいは母核5糖のみからなる糖鎖が結合した構造であれば、特に制限はない。その調製法にも何ら制限はなく、化学的手法で合成した誘導体でもかまわないが、現実的には天然糖鎖を利用する方法が優れている。

【0009】天然糖鎖を利用する方法としては、天然糖タンパク質をタンパク質分解酵素で消化させ、得られる

アミノ酸と糖鎖アスパラギンの混合物から単離する方法が報告されている。例えば、卵白アルブミンから糖鎖アスパラギンを調製した方法がTairaによって報告されている。(J. Biol. Chem. 250巻8569頁1975年参照)使用する糖タンパク質やタンパク質分解酵素、精製の方法などにも何ら制限はない。

【0010】上述のように調製された糖鎖アスパラギンの糖鎖としては、高マンノース型糖鎖、複合型糖鎖、混成型糖鎖が知られているが、そのいずれでも使用できる。また、いずれの型の糖鎖にも構成単糖の違いから様々な糖鎖の糖鎖が得られるが、そのいずれであっても、また、混合物であっても何ら差し支えない。

【0011】次に、糖鎖アスパラギンのFmoc化について説明する。

【0012】Fmoc化する方法には何ら制限はない。通常、糖鎖アスパラギンを塩基水溶液と有機溶媒の混合溶液に溶解または懸濁させ、次いで、周知のFmoc化剤を反応させる。周知のFmoc化剤としては、対応するハロゲン化物、活性エステル型の誘導体などを挙げることができる。具体的には、塩化物やコハク酸イミドエステルが挙げられ、特に、コハク酸イミドエステル誘導体(Fmoc-OSu)が好ましい。

【0013】塩基水溶液に使用する塩基としては、周知の塩基を使用できる。無機塩基としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムなどを挙げるができる。有機塩基としては、ピリジン、ジイソプロピルエチルアミンなどの三級アミンを挙げるができる。しかし、通常無機塩基を使用する。

【0014】使用する有機溶媒としては水と混和できる溶媒が好ましい。具体的には、メタノール、エタノール、N,N-ジメチルホルムアミド、1,4-ジオキサン、ジメチルスルホキシドなどを挙げるができる。これらの中では、1,4-ジオキサン、ジメチルスルホキシドが好ましい。

【0015】反応にあたっては、Fmoc化剤を過剰に用いることも可能であるが、通常、1. 0当量から3当量の範囲で、好ましくは、1. 0～1. 5当量の範囲である。

【0016】得られたFmoc糖鎖アスパラギンは高速液体クロマト、疎水クロマト、ゲルクロマト、イオン交換など通常の精製法で容易に精製できる。

【0017】つぎに、本発明化合物である一般式化1で示される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体について説明する。

【0018】本発明化合物は、一般式化2で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体であるFmoc糖鎖アスパラギンから周知のベンゾトリアゾール系活性エステルへ誘導することで調製できる。具体的には1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、3-オキシ-4-オキソ-

(4)

特開平11-255807

5

3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジンなどの化合物群とカルボン酸から形成される活性エステルを挙げる事ができる。

【0019】その調製法についても周知の方法を適用できるが、糖水酸基との反応性に乏しい試薬を用いる必要がある。例えば、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミドあるいはその類縁体との併用などもあげられるが、いわゆるカップリング試薬が操作上簡便である。

【0020】反応は、一般式2で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体であるFmoc糖鎖アスパラギンが溶解する非プロトン性極性溶媒中で行うことが重要である。こうした非プロトン性極性溶媒として、具体的には、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N-メチル-2-ピロリジノン(NMP)、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサメチルホスホリックトリアミド、ジメチルスルホキシド、ホルムアミドなどを挙げる事ができる。これらの中でDMF、NMPが好ましく、特に、NMPが操作性、溶解性の上から推奨できる。

【0021】カップリング試薬としては、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)や2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム、ヘキサフルオロホスフェート(HBTU)などの一般式3で表される周知のベンゾトリアゾール誘導体を挙げる事ができる。

【化3】

【0022】上述のように、一般式1で示される本発明化合物を製造する際には、その中間体となる一般式2で示される糖鎖アスパラギン誘導体を上記の溶媒に溶解させることが、極めて重要で、これら化合物群が溶解した溶液あるいは更に一般式3で示されるベンゾトリアゾール誘導体との混合溶液の工業的価値は高い。

【0023】上記の非プロトン性極性溶媒中で反応させる一般式2で表される糖鎖アスパラギン活性エステル誘導体の合成中間体であるFmoc糖鎖アスパラギンとベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)や2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)などの一般式3で表されるベンゾトリアゾール誘導体との反応は特に制限はない。通常は縮合試薬を1.0～3.0当量の範囲で使用できる。好ましくは、1.0～1.5当量の範囲である。

【0024】ところで、活性エステルは反応性の高い誘導体で、単離精製することは困難である。そこで、通常上記反応中にアミノ基を有する化合物を共存させ、対応するアミド誘導体を生成させる。生成する糖鎖を有するアミド化合物は、高速液体クロマト、疎水クロマト、ゲルクロマト、イオン交換など通常の精製法で容易に精製できる。

5

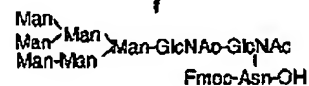
【0025】アミド化合物を生成する上記の反応の反応温度にも何ら制限はなく、0℃から溶媒の沸点までの範囲で、通常室温から50℃の範囲である。同様に、反応時間も制限は無く、通常、数時間から数日の範囲である。

【0026】以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、以下の実施例により何等の制限をうけるものではない。

【0027】

【実施例1】文献記載の方法で調製した卵白アルブミン由来の糖鎖アスパラギンH-Asn(GlcNAc2Man6)-OH 52.4 mgを1%炭酸水素ナトリウム水溶液6.2 mlに溶解し、これに9-フルオレニルメチルオキシカルボニルオキシコハク酸イミド(Fmoc-OCu) 16 mgの1,4-ジオキサン(10 ml)溶液を滴下、一夜攪拌した。反応液にエーテルを加え、分液し、水層をエーテルで洗浄した。水層のpHを3～4にクエン酸で調整した。この水溶液をアンバーライトXA D-2のカラムに通し、水で充分洗浄した。続いてメタノールで溶出し、減圧濃縮した。再度水に溶解させ、凍結乾燥したところ、Fmoc-Asn(GlcNAc2Man6)-OHが白色粉末として63mg得られた。構造をMALDI-TOFMSで確認した。実測値2870、計算値[M+Na]=2871。

【化4】



【0028】

【実施例2】卵白アルブミン由来の糖鎖アスパラギンを糖鎖の混合物のまま、実施例1と同様にFmoc化した。H-Asn(糖鎖)-OH 101 mgを用い、糖鎖の構造を実施例1で用いた糖鎖構造と仮定し、行ったところ、92.7mgのFmoc-Asn(糖鎖)-OHが得られた。高速液体クロマト(Inertsil ODS3; 0.1%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル(20-30%/30分); 1ml/min)で各成分を分離単離し、そのMALDI-TOFMS分析を行ったところ、以下の糖鎖を有する混合物であることがわかった。Man4GlcNAc1-Man3GlcNAc2-; 実測値1919, 計算値[M+Na]=1918, Man4-Man3GlcNAc2-; 実測値2119, 計算値[M+Na]=2121, Man2GlcNAc2-Man3GlcNAc2-; 実測値2021, 計算値[M+K]=2016, Man2GlcNAc3-Man3GlcNAc2-; 実測値2189, 計算値[M]=2197, Man2GlcNAc2-Man3GlcNAc2-; 実測値1985, 計算値[M]=1977, Man3-Man3GlcNAc2-; 実測値1736, 計算値[M]=1733, Man5-Man3GlcNAc2-; 実測値2063, 計算値[M]=2057, Man2-Man3GlcNAc2-; 実測値1572, 計算値[M]=1571, GlcNAc3-Man3GlcNAc2-; 実測値1858, 計算値[M]=1856。全ての糖鎖を実施例1の糖鎖であると仮定すると収率は81%であった。

(5)

特開平11-255807

7

8

【0029】

【実施例3】実施例1で調製したFmoc-Asn(GlcNAcZdan 6)-OH 5.0 mgをNMP 2mlに溶解した。これに室温で1Mジイソプロピルエチルアミン/NMP溶液2.9μlと、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)1.5 mg、及び生成した活性エステルを捕捉するアミノ化合物として5-モノ-アミノ-β-シクロデキストリン3.3 mgを加え、一夜攪拌した。実施例2と同様の高速液体クロマトによって検定し、74%の収率で活性エステル誘導体がアミノ基と反応した側鎖に天然糖鎖を有するシクロデキストリン誘導体が得られた。同様の反応を2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いて行ったところ、収率は54%であった。

【0030】

【実施例4】実施例2で調製した様々な糖鎖を有するFmoc-Asn(糖鎖)-OHの混合物10mgをNMP1mlに溶解し、モレキュラーシーブス4 Å共存下に、実施例3と同様にベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)2.8mgを活性エステルを生成させると共に、それを捕捉するアミノ化合物としてアラニンメチルエステルを1当量共存させた。高速液体クロマトにより検定したところ、83%の収率でFmoc-Asn(糖鎖)-Ala-OMeが得られた。

【0031】

【発明の効果】以上のように、本発明化合物はアミノ基を有する誘導体へ糖鎖を導入できる誘導体であり、既知の医薬や試薬、農業などの誘導体へ細胞認識能を有する糖鎖を導入できる点で、その応用範囲も極めて広範囲で、その工業的価値は大である。